

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2005 年 8 月 25 日 (25.08.2005)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2005/078119 A1

(51) 国際特許分類: C12Q 1/02, C07K 14/72, 19/00, G01N 21/78, 33/15, A01K 67/027 // C12N 15/09

TECHNOLOGY AGENCY) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県川口市本町4丁目1番8号 Saitama (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2005/002660

(72) 発明者; および

(22) 国際出願日: 2005 年 2 月 14 日 (14.02.2005)

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 梅澤 喜夫 (UMEZAWA, Yoshio) [JP/JP]; 〒162-0063 東京都新宿区市ヶ谷薬王寺町45-1-203 Tokyo (JP). 佐藤 守俊 (SATO, Moritoshi) [JP/JP]; 〒113-0023 東京都文京区向丘2-8-4-701 Tokyo (JP).

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(74) 代理人: 西澤 利夫 (NISHIZAWA, Toshio); 〒107-0062 東京都港区南青山6丁目11番1号 スリーエフ南青山ビルディング7F Tokyo (JP).

(30) 優先権データ:  
特願2004-035678 2004 年 2 月 12 日 (12.02.2004) JP

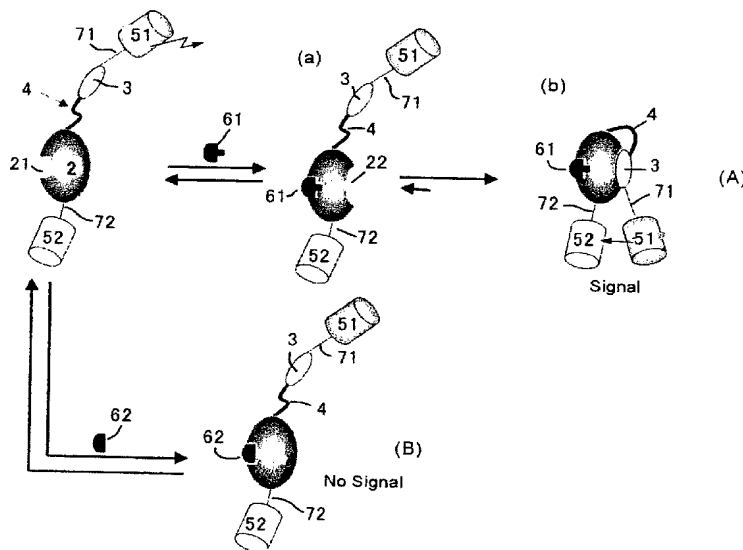
(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人科学技術振興機構 (JAPAN SCIENCE AND

[続葉有]

(54) Title: PROBE FOR DETECTING NUCLEAR RECEPTOR AGONIST OR ANTAGONIST AND METHOD OF SCREENING AGONIST OR ANTAGONIST TO NUCLEAR RECEPTOR WITH THE USE OF THE SAME

(54) 発明の名称: 核内レセプターのアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブとそれを用いた核内レセプターに対するアゴニストおよびアンタゴニストのスクリーニング方法



(57) Abstract: A probe for detecting an agonist or an antagonist to a nuclear receptor characterized in that at least a ligand-recognition site containing a ligand-binding domain of the nuclear receptor is ligated to a binding-responsive site containing a peptide chain specifically binding to a coactivator-binding domain in the ligand-binding domain of the nuclear receptor via a flexible linker, and two marker sites, which allow the detection of the approach to each other, are ligated to the respective ends of the fused structure of [ligand-recognition site/linker/binding-responsive site].

(57) 要約: 少なくとも、核内レセプターのリガンド結合ドメインを含むリガンド認識部位と、該核内レセプターリガンド結合ドメインにおける活性化補助因子結合ドメインに特異的に結合するペ

[続葉有]

WO 2005/078119 A1



DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE,

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

ブチド鎖を含む結合応答部位が、屈曲性のリンカーを介して連結されており、この[リガンド認識部位/リンカー/結合応答部位]融合構造の両末端に、互いの接近が検出可能な二つのマーカー部位が各々連結されていることを特徴とする核内レセプターのアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブとする。

## 明 細 書

核内レセプターのアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブとそれを用いた核内レセプターに対するアゴニストおよびアンタゴニストのスクリーニング方法

### 技術分野

この出願の発明は、核内レセプターのアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブに関するものである。さらに詳しくは、この出願の発明は、核内レセプターに対するアゴニストとアンタゴニストを選択性高く検出、定量するためプローブと、それを用いた核内レセプターに対するアゴニストおよび／またはアンタゴニストのスクリーニング方法に関するものである。

### 背景技術

エストロゲン、プロゲステロン、アンドロゲン、グルココルチコイド、ミネラルコルチコイドなどのステロイドホルモンや、甲状腺ホルモン、レチノイン酸等の脂溶性シグナル分子は、標的組織（細胞）の増殖・分化の制御、個体発生、精神活動等、高等動物の生命活動全般に深く関わりとともに、多くの疾患の発症や悪化にも関与していることが明らかになっている。また、核内には、これらの脂溶性シグナル分子に対する特異的なレセプターが存在することが知られており、これらのレセプター群は核内レセプターと総称され、一つの遺伝子スーパーファミリーを形成している。

このような核内レセプターは、リガンド依存性転写因子であり、前記の脂溶性シグナル分子と特異的に結合し、標的遺伝子のプロモーター上の応答配列を認識して結合することにより転写促進作用を発揮することが知られている。

また、最近の核内レセプターの研究により、核内レセプターの転写制御機構においてはリガンドだけでなく、転写を各々正負に制御する活性化補助因子の機能が重要な役割を果たすことが明らかになっている。

例えば、多くの生殖組織の成長、発達、維持の原因となるエストロゲンは（非

特許文献1)、エストロゲンレセプター (ER) に結合することにより、生理学的ならびに薬理学的効果を発揮する (非特許文献2および3)。一方、ステロイドレセプター活性化補助因子1 (SRC-1) はp160核内ホルモンレセプター活性化補助因子ファミリーに属し、ERがアゴニストと複合体を形成した場合に、ERの活性化補助因子結合ドメインと相互作用してERの転写活性を誘起するようになるが、アゴニストが存在しない場合やERがアンタゴニストと結合している場合にはこのような現象が生じないことが明らかにされている (非特許文献4)。このとき、アゴニストはERの高次構造の変化を誘導し、これによりER上に活性化補助因子結合ドメインが形成され、ERへの活性化補助因子の結合が促進および安定化される。同時にERと活性化補助因子の結合により、ERとアゴニストの結合が相互的に安定化され、アゴニストのERからの解離速度が顕著に低下する (非特許文献5)。

ところで、従来より、天然エストロゲンに対して構造的類似性をほとんど有さない多くの合成化学物質が、ERと結合し、生体内での天然エストロゲン活性を模倣または阻害する内分泌攪乱物質として作用することが報告されている (非特許文献6～9)。野生動物やヒトが発達の比較的初期にこのようなエストロゲン性化学物質に曝露された場合には、生殖器官の異常、生殖器重量の減少、精子の数的減少や質低下が生じることが知られている (非特許文献10～12)。同様に、エストロゲン以外の脂溶性シグナル分子に関しても、内分泌攪乱物質の存在や影響が明らかにされている。

そこで、ERに対する物質の結合性を試験する方法について多くの研究が進められている (非特許文献7、13～16) が、これら従来の結合試験方法は、いずれも競合反応に基づくものであり、通常、試験物質がERに結合された標識リガンド (一般的には、放射性 $17\beta$  エストラジオール (E2)) を置換するものである。このような方法では、内分泌攪乱物質の大規模なスクリーニングが可能であるが、例えば、アンタゴニストの場合のように、レセプターに対する物質の結合が必ずしも転写活性を起こすとは限らないため、試験物質がアゴニストとして作用するのか、アンタゴニストとして作用するのかを区別できないという問題があった。

また、これら従来の試験方法は、水溶性の低い物質の結合親和性を調べるには不向きであるという問題もあった。さらに、生理学的条件より低い温度でのインキュベーションが必要である上、測定前に数回の洗浄を行うことにより遊離の放射性標識分子を除去する必要がある、これらの操作によって ER とリガンドの反応平衡が乱される場合があるという問題もあった。

最近になって蛍光偏光結合アッセイ（非特許文献 17）、電気化学的結合アッセイ（非特許文献 18）、表面プラズモン共鳴バイオセンサー技術（非特許文献 19）などの放射性同位元素を使用しない新しい *in vitro* 結合アッセイ法も提案されているが、これらもエストロゲンに対するアゴニストとアンタゴニストを区別できない。また、レセプター結合アッセイは大量の精製レセプター蛋白質を必要とする。

さらに、化学物質のエストロゲン感受性細胞に対する増殖刺激能力を分析する細胞増殖アッセイとして、MCF-7 細胞や T47D 細胞を用いる E-スクリーニング法が知られている（非特許文献 20）。また、ある化学物質による細胞培養中のレポーター遺伝子作成物に対する転写刺激能を分析する手法としては、酵母や哺乳類細胞を対象とするレポーター遺伝子アッセイ（非特許文献 21、22）が、エストロゲン活性を有する物質を特定するための非常に有用な方法として知られている。これら E-スクリーニング法とレポーター遺伝子アッセイ法では、アゴニストとアンタゴニストを区別することができるが、哺乳類細胞や酵母を含む培地にリガンドを添加してから結果を得るまでに約 1 日かかるという問題があった。

したがって、エストロゲンを初めとする核内レセプターに対するアゴニストやアンタゴニストを高速で、選択性高くスクリーニングできる簡便な方法は知られていなかったのが実情である。

そこで、この出願の発明は、以上のとおりの事情に鑑みてなされたものであり、従来技術の問題点を解消し、核内レセプターに対するアゴニストやアンタゴニストを高選択的にスクリーニングするための簡便で精度高い方法を提供することを課題としている。

## 文献

特許文献1：特願2003-145466号

特許文献2：特願2003-301259号

非特許文献1：Ciocca, D. R. and Roig, L. M. V. *Endocr. Rev.* 1995, 16, 35-62.

非特許文献2：Tsai, M. J. and O' Malley, B. W. *Annu. Rev. Biochem.* 1994, 63, 451-486.

非特許文献3：Nilsson, S. et al. *Physiological Rev.* 2001, 81, 1535-1565.

非特許文献4：McKenna, N. J. et al. *Endocr. Rev.* 1999, 20, 321-344.

非特許文献5：Gee, A. C. et al. *Mol. Endocrinol.* 1999, 13, 1912-1923.

非特許文献6：Korach, K. S. *Endocrinology* 1993, 132, 2277-2278.

非特許文献7：Shelby, M. D. et al. *Environ. Health Perspect.* 1996, 104, 1296-1300.

非特許文献8：Oosterkamp, A. J. et al. *Anal. Chem.* 1997, 69, 545-553.

非特許文献9：Sonnenschein, C.; Soto, A. M. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1998, 65, 143-150.

非特許文献10：Colborn T. *Environ. Health Perspect.* 1995, 103, 135-136.

非特許文献11：Neubert, D., *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 1997, 26, 9-29.

非特許文献12：Daston, G. P. et al. *Reprod. Toxicol.* 1997, 11, 465-481.

非特許文献13：Salomonsson, M. et al. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1994, 50, 313-318.

非特許文献14：Kuiper, G. G. J. M. et al. *Endocrinology* 1997, 138, 863-870.

非特許文献15：Tabira, T. et al. *Eur. J. Biochem.* 1999, 262, 240-245.

非特許文献16：Blair, R. M. et al. *Toxicol. Sci.* 2000, 54, 138-155.

非特許文献17：Bolger, R. et al. *Environ. Health Perspect.* 1998, 106, 551-557.

非特許文献18：Kuramitz, H. et al. *Anal. Chem.* 2002, 74, 533-538.

非特許文献 19 : Usami, M. et al. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 2002, 81, 47-55.

非特許文献 20 : Soto, A. M. et al. Environ. Health Perspect. 1995, 103 (Suppl. 7), 113-122.

非特許文献 21 : Bronstein, I. et al. J. Anal. Biochem. 1994, 219, 169-181.

非特許文献 22 : Gaido, K. W. et al. Toxicol. Appl. Pharmacol. 1997, 143, 205-213.

非特許文献 23 : Herry, D. M. et al. Nature 1997, 387, 733-736.

非特許文献 24 : Mak, H. Y. et al. Mol. Cell. Biol. 1999, 19, 3895-3903.

非特許文献 25 : Weatherman, R. V. et al. Mol Endocrinol. 2002, 16, 487-496.

非特許文献 26 : Ueda H. et al. J. Immunol Methods. 2003, 279 (1-2), 209-18.

非特許文献 27 : Pollock, B. A. ; Heim, R. Cell Biol, 1999, 9, 57-60.

非特許文献 28 : Mochizuki, N. et al. Nature 2001, 411, 1065-1068.

非特許文献 29 : Sato M. et al. Nature Biotech. 2002, 20, 287-294.

非特許文献 30 : Sasaki, K. et al. J. Biol. Chem. 2003, 278, 30945-30951.

非特許文献 31 : Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77; 7380-7384, 1980

非特許文献 32 : Brzozowski, A. M. et al. Nature 1997, 389, 753-758.

非特許文献 33 : Shiau, A. K. et al. Cell 1998, 95, 927-937.

非特許文献 34 : Routledge, E. J. et al. J. Biol. Chem. 2000, 275, 35986-35993.

非特許文献 35 : Fang, H. et al. Chem. Res. Toxicol. 2001, 14, 280-294.

非特許文献 36 : Jordan, V. C. et al. Cancer Res. 2001, 61, 6619-6623.

#### 発明の開示

この出願の発明は、上記の課題を解決するものとして、第1には、少なくとも、核内レセプターのリガンド結合ドメインを含むリガンド認識部位と、該核内レセプターリガンド結合ドメインにおける活性化補助因子結合ドメインに特異的に結合するペプチド鎖を含む結合応答部位が、屈曲性のリンカーを介して連結されており、この[リガンド認識部位／リンカー／結合応答部位]融合構造の両末端に、互いの接近が検出可能な二つのマーカー部位が各々連結されていることを特徴とする核内レセプターのアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブを提供する。

この出願の発明は、また、第2には、リガンド認識部位がグルココルチコイドレセプター、エストロゲンレセプター、プロゲステロンレセプター、ペルオキシソーム増殖因子活性化レセプター、アンドロゲンレセプター、甲状腺ホルモンレセプター、レチノイン酸レセプター、ビタミンDレセプター、およびオーファンレセプターからなる群より選択されるいずれかの核内レセプターのリガンド結合ドメインを含むものであるアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブを、第3には、リガンド認識部位がエストロゲンレセプター $\alpha$ リガンド結合ドメイン、ペルオキシソーム増殖因子活性化レセプターリガンド結合ドメインまたはアンドロゲンレセプターリガンド結合ドメインであるアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブを提供する。

さらに、この出願の発明は、第4には、結合応答部位がステロイドレセプター活性化補助因子1の核内レセプター相互作用ドメインペプチドであるアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブを、第5には、結合応答部位が配列番号1のモチーフを含むものであるアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブを、そして、第6には、互いの接近が検出可能な二つのマーカー部位が黄色蛍光タンパク質とシアン蛍光タンパク質であるアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブを提供する。

この出願の発明は、第7には、核内レセプターに対するアゴニストをスクリーニングするための方法であって、前記いずれかのアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブとアゴニスト候補物質を共存させ、アゴニスト候補物質非存在下および存在下におけるシグナルの変化を測定するアゴニストのスクリーニング方法



を、また、第8には、前記いずれかのアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブを発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入し、細胞内で該プローブとアゴニスト候補物質を共存させるアゴニストのスクリーニング方法を、第9には、前記いずれかのアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブを発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入し、非ヒト動物全能性細胞を個体発生することによって、この動物またはその子孫動物の全細胞において、該プローブとアゴニスト候補物質を共存させるアゴニストのスクリーニング方法を提供する。

また、さらに、この出願の発明は、第10には、核内レセプターに結合し、拮抗作用を示すアンタゴニストをスクリーニングするための方法であって、既知のアゴニストの存在下で、前記いずれかのアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブと過剰量のアンタゴニスト候補物質を共存させ、アンタゴニスト候補物質非存在下および存在下におけるシグナルの変化を測定するアンタゴニストのスクリーニング方法を、第11には、前記いずれかのアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブを発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入し、細胞内で、該プローブと既知のアゴニストとアンタゴニスト候補物質を共存させるアンタゴニストのスクリーニング方法を、第12には、前記いずれかのアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブを発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入し、非ヒト動物全能性細胞を個体発生することによって、この動物またはその子孫動物の全細胞において、該プローブと既知のアゴニストとアンタゴニスト候補物質を共存させるアンタゴニストのスクリーニング方法を提供する。

そして、第13には、この出願の発明は、前記いずれかのアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブを発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入し、非ヒト動物全能性細胞を個体発生することによって得られる非ヒト動物またはその子孫動物をも提供する。

#### 図面の簡単な説明

図1は、この発明のアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブの構成および作用を例示した概略模式図である。

図 2 A は、この発明の実施例において作製された、エストロゲンレセプターのアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブおよび変異プローブの構成を示した概略模式図であり（a：プローブ、b：変異プローブ）、図 2 B は、ペルオキシソーム増殖因子活性化レセプターのアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブおよび変異プローブの構成を示した概略模式図であり、図 2 C は、アンドロゲンレセプターのアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブおよび変異プローブの構成を示した概略模式図であり（a：プローブ、b：変異プローブ）である。

図 3 A は、この発明の実施例において、プローブを発現させた CHO-K1 細胞を 100 nM E2 で刺激した際の FRET 変化の経時変化を示した細胞画像であり、図 3 B は、PK-15 細胞を 100 nM DHT で刺激した際の FRET 変化の経時変化を示した細胞画像である。なお、480/535 nm の蛍光強度比が疑似カラー画像として示されている。

図 4 A は、この発明の実施例において、プローブを発現させた CHO-K1 細胞を 100 nM E2 で刺激した際の FRET 変化の経時変化を示した図であり（a：E2 添加後、b：E2 未添加、c：変異プローブを発現させた CHO-K1 細胞の E2 刺激）、図 4 B は、この発明の実施例において、プローブを発現させた CHO-K1 細胞を 15d-PGJ<sub>2</sub> で刺激した際の FRET 変化を示した図（a：経時変化、b：15d-PGJ<sub>2</sub> 濃度と蛍光強度比変化の値の関係（反応曲線））であり、図 4 C は、この発明の実施例において、プローブを発現させた CHO-K1 細胞を pioglitazone で刺激した際の FRET 変化を示した図（a：経時変化、b：pioglitazone 濃度と蛍光強度比変化の値の関係（反応曲線））であり、図 4 D は、この発明の実施例において、プローブを発現させた CHO-K1 細胞を 100 nM DHT で刺激した際の FRET 変化の経時変化を示した図であり（a：DHT 添加後、b：DHT 未添加、c：変異プローブを発現させた PK-15 細胞の DHT 刺激）である。

図 5 A は、この発明の実施例において、CHO-K1 細胞内でプローブを発現させ、DES、Gen、Bis-A および NP の外来性エストロゲン添加した際の濃度と蛍光強度比変化の値の関係（反応曲線）を示した図であり、図 5 B は、PK-15 細胞内でプロ

ープを発現させ、DHT、テストテロン、プロジェステロンおよびコルチゾールを添加した際の濃度と蛍光強度比変化の値の関係（反応曲線）を示した図である。

図6は、この発明の実施例において、プローブを発現させた CHO-K1 細胞を、E2、ICI 182,780、および OHT（それぞれ 1.0  $\mu$ M）により刺激した際の FRET 応答の変化を示した図（a : 1.0  $\mu$ M E2、b : 1.0  $\mu$ M ICI 182,780、c : 1.0  $\mu$ M OHT、d : 1.0  $\mu$ M ICI 182,780/1.0  $\mu$ M E2、e : 1.0  $\mu$ M ICI 182,780/10  $\mu$ M E2、f : 1.0  $\mu$ M ICI 182,780/100  $\mu$ M E2、g : 1.0  $\mu$ M OHT/1.0  $\mu$ M E2、h : 1.0  $\mu$ M OHT/10  $\mu$ M E2、i : 1.0  $\mu$ M OHT/100  $\mu$ M E2）である。

図7は、プローブを発現させた CHO-K1 細胞を、10  $\mu$ M の BADGE により刺激した際の FRET 応答の変化を示した図である。

図8は、この発明の実施例において、プローブを発現させた PK-15 細胞を、DHT (1.0 nM、10 nM、100 nM) + フルタミドもしくはプロシミドン（それぞれ 10  $\mu$ M）、フルタミド（100 nM）のみ、プロシミドン（100 nM）のみ、DHT (1.0 nM、10 nM、100 nM) のみにより刺激した際の FRET 応答の変化を示した図である。

図9 Aは、プローブを発現させた PK-15 細胞を、1.0  $\mu$ M フルタミドにより刺激した際の FRET 応答の変化を示した図であり、図9 Bは、100 nM テストテロン + 10  $\mu$ M フルタミドにより刺激した際の FRET 応答の変化を示した図である。

なお、図中の符号は、次のものを示す。

- A アゴニスト共存下
- B アンタゴニスト共存下
- 1 アゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ
- 2A リガンド認識部位 (ER  $\alpha$ -LBD)
- 2B リガンド認識部位 (PPAR  $\gamma$ -LBD)
- 2C リガンド認識部位 (AR-LBD)
- 3 結合応答部位 (SRC-1 NR boxII)
- 4 リンカー
- 51 マーカー部位 (CFP)
- 52 マーカー部位 (YFP)

- 61 アゴニスト
- 62 アンタゴニスト
- 71 リンカー
- 72 リンカー

### 発明を実施するための最良の形態

この出願の発明のアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブは、少なくとも、各々異なる機能を有する4つの部位からなるものである。つまり、図1に示されるように、このアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ(1)は、少なくとも：

- ・核内レセプターのリガンド結合ドメイン(以下、NR-LBDと記載する)を含むリガンド認識部位(2)と、
  - ・NR-LBDの活性化補助因子結合ドメイン(22)に特異的に結合できるペプチド鎖を含む結合応答部位(3)と、
  - ・リガンド認識部位(2)と結合応答部位(3)を連結する屈曲性のリンカー(4)と、
  - ・リガンド認識部位(2)へのアゴニスト(61)の結合により互いが近接した際に、検出可能なシグナルを発する二つのマーカ部位(51、52)、
- からなるものである。

この出願の発明のアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ(1)は、アゴニスト(61)との共存下およびアンタゴニスト(62)との共存下で、各々異なる立体構造をとり、その差異をシグナル変化として検出することのできるものである。

アゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ(1)がアゴニスト(61)と共存する場合には、アゴニスト(61)がアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ(1)におけるリガンド認識部位(2)のリガンド結合ポケット(21)を認識し、そこに結合する(図1A-a)。このとき、NR-LBDの立体構造が変化し、リガンド認識部位(2)に活性化補助因子結合ドメイン(22)が形成される。続いて、

結合応答部位 (3) が、この活性化補助因子結合ドメイン (22) を認識し、リンカー (4) が屈曲することにより結合応答部位 (3) と活性化補助因子結合ドメイン (22) の結合が起こる (図 1 A-b)。これにより、アゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ (1) の立体構造が変化し、二つのマーカー部位 (51、52) が近接する。

一方、この出願の発明のアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ (1) がアンタゴニスト (62) と共存する場合には、アンタゴニスト (62) は、アゴニスト (61) の場合と同様に、リガンド認識部位 (2) におけるリガンド結合ポケット (21) を認識して結合する (図 1 B)。しかし、このとき、リガンド認識部位 (2) における NR-LBD の立体構造変化は起こらず、活性化補助因子結合ドメイン (22) も形成されない。したがって、結合応答部位 (3) のリガンド認識部位 (2) への結合は起こらず、アゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ (1) の立体構造も変化しない。すなわち、二つのマーカー部位 (51、52) は離れたままとなる。

このようなアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ (1) において、リガンド認識部位 (2) は、とくに限定されない。例えば、グルココルチコイドレセプター、エストロゲンレセプター、プロゲステロンレセプター、アンドロゲンレセプター、甲状腺ホルモンレセプター、レチノイン酸レセプター、ビタミンDレセプター、ペルオキシソーム増殖因子活性化レセプター、あるいはリガンドが不明なオーファンレセプター等、各種の核内レセプターのリガンド結合ドメインを含むものが適用できる。したがって、この出願の発明において、リガンド認識部位 (2) とは、核内レセプターのリガンド結合ドメインそのもの、リガンド結合ドメインを含む核内レセプターの部分構造、および核内レセプターそのものを意味する。もちろん、核内レセプターのリガンド結合ドメインは、公知のものだけでなく、新たに明らかになったものであってもよい。

この出願の発明のアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ (1) において、リガンド認識部位 (2) とアゴニスト (61) の結合により形成される活性化補助因子結合ドメイン (22) に特異的に結合できる結合応答部位 (3) は、リガンド

認識部位 (2) における活性化補助因子結合ドメイン (22) に特異的に結合するペプチド鎖を含むものであればよく、合成および天然のあらゆるペプチド鎖を用いることができる。例えば、エストロゲンレセプターに対する活性化補助因子としては、ステロイド受容体活性化補助因子 1 (SRC-1) が知られており、SRC-1 内部には核内レセプター相互作用ドメインが存在し、これは等間隔に存在する LXXLL モチーフ (配列番号 1) または NR ボックスと呼ばれるロイシン豊富なシグネチャーモチーフの保存性コピー 3 個により構成されている。このようなモチーフは、エストロゲンレセプターに対する SRC-1 の相互作用を媒介するために重要であることが知られている (非特許文献 5、23～25) ことから、リガンド認識部位 (2) をエストロゲンレセプターのリガンド結合ドメインを含むものとする場合には、このようなモチーフを有するポリペプチドが結合応答部位 (3) として好ましく適用できる。さらに、SRC-1 そのものや、SRC-1 の活性化補助因子ペプチド (配列番号 2) (非特許文献 23～25) が例示される。

これらリガンド認識部位 (2) と結合応答部位 (3) は、屈曲性のリンカー (4) を介して連結されている。このようなリンカー (4) は、屈曲性を有するものであればよく、その構造や配列はとくに限定されない。例えば、高分子鎖、天然または合成のペプチド鎖が例示される。このようなリンカー (4) により、アゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ (1) のリガンド認識部位 (2) と結合応答部位 (3) が連結されるとともに、両者が近づいたり離れたりできるようになり、リガンド認識部位 (2) に形成された活性化補助因子結合ドメイン (22) への結合応答部位 (3) の結合・脱離が可能となる。

この出願の発明のアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ (1) では、アゴニスト (61) との結合をシグナル発信する部位として、互いの近接が検出可能な二つのマーカー部位 (51、52) が連結されている。このとき、二つのマーカー部位 (51、52) は、リガンド認識部位 (2) と結合応答部位 (3) の結合により生じるアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ (1) の立体構造の変化にตอบสนองして、精度高くシグナル変化を示すものでなければならない。このようなシグナル変化を示すものとしては、レニラルシフェラーゼ補完法によるもの (特許文献

1)、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ補完法によるもの（非特許文献26）、単色蛍光プローブによるもの（特許文献2）などが例示される。生化学の分野においては、一般的に種々の蛍光発色団も用いられるが、立体構造の変化に敏速に応答するものとしては、蛍光共鳴エネルギー移動（以下、FRET）（非特許文献27～30）の生起により色調に変化を来すものが知られている。

したがって、この出願の発明のアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ(1)においては、分子認識の結果を検出可能とする部位として、互いの近接が検出可能な二つのマーカー部位(51、52)が、[リガンド認識部位／リンカー／結合応答部位]融合構造の両末端に一つずつ連結されている。このようなマーカー部位としては、レニラルシフェラーゼのN-末端側のポリペプチドを含む発色団と、レニラルシフェラーゼの残るC-末端側のポリペプチドを含む発色団の組み合わせや、 $\beta$ -ガラクトシダーゼのN-末端側のポリペプチドを含むフラグメントと、 $\beta$ -ガラクトシダーゼの残るC-末端側のポリペプチドを含むフラグメントの組み合わせ、緑色蛍光タンパク質(GFP)のブルーシフト変異タンパク質であるシアン蛍光タンパク質(CFP)とGFPのレッドシフト変異タンパク質である黄色蛍光タンパク質(YFP)の組み合わせ等が例示される。

とくに、CFPとYFPの組み合わせによれば、CFPがFRETのドナーとして、YFPがFRETのアクセプターとして作用し、プローブの立体構造の変化に敏速に応答することから、好ましい。このとき、ドナー／アクセプターは、リガンド認識部位(2)および結合応答部位(3)のどちらに結合していてもよい。例えば、図2A-aや図2C-aに示されるように、結合応答部位(3)のN-末端にCFPを、リガンド認識部位(2)のC-末端にYFPを連結できる。もちろん、CFPとYFPの連結位置は反対であってもよい。

なお、以上のとおりのこの出願の発明のアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ(1)において、マーカー部位(51、52)は、各々、適当なリンカー(71、72)を介してリガンド認識部位(2)や結合応答部位(3)に連結されていてもよいし、直接連結されていてもよい。

以上のとおりのアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ(1)を用いてア

ゴニスト (61) やアンタゴニスト (62) を検出、定量、およびスクリーニングすることが可能となる。

前記のとおり、この出願の発明のアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ (1) をアゴニストと共存させると、アゴニスト (61) がリガンド認識部位 (2) のリガンド結合ポケット (21) を認識し、結合する。これにより、リガンド認識部位 (2) の立体構造に変化が生じ、活性化補助因子結合ドメイン (22) が形成される。すると、リガンド認識部位 (2) に屈曲性リンカー (4) を介して連結された結合応答部位 (3) がこの活性化補助因子結合ドメイン (22) を認識し、結合する。これにより、二つのマーカー部位 (51、52) が近接し、それによりシグナル変化、例えば、発光や蛍光の生起、強度や波長の変化等が生じる。

そこで、例えば、患者の体内から採取された試料 (尿、血液など) に、アゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ (1) を添加し、測定を行い、そのシグナル変化を対照 (ブランク) のものと比較すれば、特定の核内レセプターに対するアゴニストが存在するか否かを判断することが可能となる。すなわち、例えば、二つのマーカー部位 (51、52) が前記の CFP と YFP の場合には、ドナーとして作用する発色団 (仮に 51 とする) に励起波長を照射し、該発色団 (51) の蛍光強度を測定した場合、アゴニストが存在すれば蛍光強度がブランクのそれよりも低下する。逆に、二つの蛍光発色団 (51、52) のうち、ドナーとして作用する発色団 (仮に 51 とする) に励起波長を照射し、アクセプターとして作用する発色団 (この場合 52) の蛍光強度を測定した場合には、蛍光強度はブランクのそれよりも増大する。また、蛍光強度とアゴニスト (61) 量 (濃度) の関係を予め検量することにより、アゴニスト (61) を定量することもできる。

さらに、この出願の発明では、前記のアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ (1) を用いたアゴニストのスクリーニング方法をも提供する。具体的には、アゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ (1) とアゴニスト候補物質を共存させ、シグナルの変化を測定することにより、アゴニストをスクリーニングすることができる。候補物質がアゴニストとして作用するものであれば、前記のとおり機構により二つのマーカー部位 (51、52) が近接し、シグナルの変化が見ら



れる。一方、候補物質がアゴニストとして作用しない場合には、このようなシグナルの変化は見られない。

また、この出願の発明のアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ (1) を用いれば、スクリーニングされた候補物質のアゴニストとしての強度を測定することも可能になる。前記のとおり、アゴニスト (61) がリガンド認識部位 (2) に結合することにより、結合応答部位 (3) と活性化補助因子結合ドメイン (22) の結合が生じるが、このとき、該アゴニスト (61) とリガンド認識部位 (2) の結合力が強い場合には、活性化補助因子結合ドメイン (22) と結合応答部位 (3) の結合が安定化され、その作用により同時にアゴニスト (61) とリガンド認識部位 (2) の結合も安定化する。そのため、アゴニスト (61) のリガンド認識部位 (2) からの解離速度が低下し、反応平衡がアゴニスト結合形成方向にシフトする。したがって、例えば、二つのマーカー部位 (51、52) を CFP と YFP とした前記の例では、アゴニスト (61) 添加時からの蛍光強度の経時変化を測定すれば、蛍光強度変化の増大が観察される。一方、アゴニスト (61) のリガンド認識部位 (2) に対する結合力が弱い場合には、活性化補助因子結合ドメイン (22) と結合応答部位 (3) の結合が十分に安定化されず、その影響でアゴニスト (61) とリガンド認識部位 (2) の結合も解離し易いものとなる。すなわち、反応平衡が維持されるか、アゴニスト解離方向にシフトする。したがって、前記の例では、アゴニスト (61) 添加時からの蛍光強度の経時変化を測定した場合には、蛍光強度の変化率が一時的に大きくなっても、時間の経過とともに小さくなっていくことが観察される。

なお、以上のとおりのアゴニストのスクリーニング方法では、高い測定精度を維持するために、スクリーニングの対照となる候補物質以外にアゴニストやアンタゴニストが存在しないものとするのが望ましい。

この出願の発明では、また、前記のアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ (1) を用いてアンタゴニストをスクリーニングする方法をも提供する。具体的には、内在性アゴニスト等の既知のアゴニストの存在下で、アゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ (1) と、過剰量のアンタゴニスト候補物質を共存さ

せ、シグナルの変化を測定することによりアンタゴニストをスクリーニングすることができる。このとき、既知のアゴニストとアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ (1) のみが存在する状態では、アゴニストとリガンド認識部位 (2) が結合することにより、二つのマーカ部位 (51、52) が近接し、シグナルが検出される。しかし、過剰量のアンタゴニスト候補物質が共存する場合には、候補物質が拮抗作用を示せばこれがアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ (1) におけるリガンド認識部位 (2) のリガンド結合ドメイン (22) を認識し、選択的に結合するようになる。したがって、このようなシグナルは徐々に減少する。一方、アンタゴニスト候補物質が拮抗作用を示さない場合には、アゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ (1) におけるアゴニストとリガンド認識部位 (2) との結合が維持され、二つのマーカ部位 (51、52) が近接した状態が持続する。そこで、予めアンタゴニスト候補物質非共存下でのシグナル、例えば蛍光強度を測定し、その結果を過剰量のアンタゴニスト候補物質の共存下での蛍光強度と比較すれば、該候補物質がアンタゴニストとして作用するか否かが正確に判断できる。

具体的には、二つのマーカ部位 (51、52) を、近接することにより FRET を生じる蛍光発色団とした場合、ドナーとして作用する発色団 (仮に 51 とする) に励起波長を照射し、該発色団 (51) の蛍光強度を測定した場合、アンタゴニスト共存下では、非共存下 (つまり、既知のアゴニストのみ存在下) に比べて蛍光強度が増大する。逆に、二つの蛍光発色団のうち、ドナーとして作用する発色団 (仮に 51 とする) に励起波長を照射し、アクセプターとして作用する発色団 (この場合 52) の蛍光強度を測定した場合には、アンタゴニスト共存下では、蛍光強度の低下が見られる。

以上のとおりのアゴニストのスクリーニング方法およびアンタゴニストのスクリーニング方法において、アゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ (1) を、アゴニスト、アゴニスト候補物質、アンタゴニスト候補物質等と共存させる方法は限定されず、様々な方法が考えられる。例えば、試料溶液中でアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ (1) とアゴニスト候補物質、もしくは既知のアゴ

ニスト／過剰量のアンタゴニスト候補物質を共存させる方法が挙げられる。このような方法では、アゴニストを *in vitro* で検出・定量、スクリーニングできる。

また、この出願の発明のスクリーニング方法では、アゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ (1) を組み込んだ発現ベクターを個々の培養細胞に導入する方法により、細胞内でアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ (1) とアゴニスト候補物質やアンタゴニスト候補物質を共存させることができる。発現ベクターとしては、動物細胞発現用のプラスミドベクターが好ましく用いられる。このようなプラスミドベクターを細胞に導入する方法としては、電気穿孔法、リン酸化カルシウム法、リポソーム法、DEAE デキストラン法等の公知の方法を採用することができる。このように、アゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ (1) を組み込んだ発現ベクターを細胞に導入する方法では、細胞をアゴニスト候補物質、既知のアゴニスト、アンタゴニスト候補物質等で刺激することにより、細胞を破壊することなく、アゴニストやアンタゴニストを *in vivo* でスクリーニングできる。

さらに、この出願の発明では、アゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ (1) を発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入し、非ヒト動物全能性細胞を個体発生することによって、全細胞においてアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ (1) が存在しているトランスジェニック非ヒト動物が得られる。トランスジェニック非ヒト動物は、公知の作成法（例えば、非特許文献 3 1）に従って作製することができる。このようなトランスジェニック非ヒト動物は、すべての体細胞にアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ (1) を保有しており、体内においてアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ (1) と内在性のアゴニストを共存させることができる。また、このような非ヒト動物の体内に医薬品や内分泌攪乱物質などの検査物質や候補物質を導入することにより、体内で、アゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ (1) とアゴニスト候補物質やアンタゴニスト候補物質を共存させることができ、細胞および組織におけるシグナル変化を測定することにより、様々な物質のスクリーニングを行うことが可能となる上、医薬品、内分泌攪乱物質、あるいはこれらの候補物質による生命活動や疾患への影

響や効果を調査することも可能となる。さらに、このようなトランスジェニック非ヒト動物を用いることにより、内在性アゴニストが分泌される時期や条件等の生体内動態を可視化分析することも可能となる。

なお、以上のとおりのスクリーニング方法において、スクリーニングの対象となるアゴニストやその候補物質は、天然物質であってもよいし、ゲンステイン（以下 Gen とする；植物エストロゲン）、ジエチルスチルベストロール（以下 DES とする；スチルベン）、ビスフェノール A（以下 Bis-A とする；ニフェノール性物質）、ノニルフェノール（以下 NP とする；アルキルフェノール）等の合成物質、また、15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin  $J_2$  (15d-PG $J_2$ )、テストステロン、5 $\alpha$ -ジヒドロテストステロン (5 $\alpha$ -dihydrotestosterone；DHT) 等であってもよい。また、アンタゴニストやその候補物質は、4-hydroxytamoxifen (OHT)、ICI 182, 780、フルタミド、酢酸シプロテロン (cyproterone acetate；CPA) 等が例示されるが、これらに限定されない。

そして、上記のとおりのこの出願の発明の効果についてまとめると、第1～6の発明であるアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブでは、アゴニストが核内レセプターのリガンド結合ドメインに結合した場合には、核内レセプターリガンド結合ドメインの立体構造が変化し、活性化補助因子結合ドメインが形成される。このとき、屈曲性のリンカーを介してリガンド認識部位に連結されている結合応答部位が、この活性化補助因子結合ドメインを認識し、結合する。これにより、融合構造、すなわち「リガンド認識部位／リンカー／結合応答部位」の両末端に連結された二つのマーカー部位が近づきシグナルが検出可能となる。一方、このようなアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブでは、核内レセプターのリガンド結合ドメインにアンタゴニストが結合した場合には、核内レセプターリガンド結合ドメインの立体構造変化は起こらず、活性化補助因子結合ドメインも形成されない。そのため、前記融合構造の両末端に連結された二つのマーカー部位は離れたままとなり、検出可能なシグナルを発しない。したがって、このようなアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブを使用することにより、該核内レセプターに対するアゴニストやアンタゴニストを選択的に検出、定量できるよう

になる。また、特定の物質が、該核内レセプターに対するアゴニストとして作用するか、アンタゴニストとして作用するかを、迅速に、精度高く判定することが可能になる。

また、第7の発明では、アゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブとアゴニスト候補物質を共存させ、アゴニスト候補物質非存在下および存在下におけるシグナルの変化を測定することにより、簡便に、精度高く該候補物質が核内レセプターに対するアゴニストとして作用するか否かをスクリーニングできる。

さらに、第8の発明では、アゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブを発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入し、細胞内で該プローブとアゴニスト候補物質を共存させることにより、候補物質がアゴニストとして作用するか否かを *in vivo* で判別することが可能となる。

第9の発明では、アゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブを発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入し、非ヒト動物全能性細胞を個体発生することによって、この動物またはその子孫動物（前記第13の発明）の全細胞において、該プローブとアゴニスト候補物質を共存させることができる。これにより、該候補物質が核内レセプターに対するアゴニストとして作用するか否かを判別できるとともに、この非ヒト動物の生命活動や疾患に対する該物質の影響や効果をモニターすることが可能となる。また、このような非ヒト動物を用いて、核内レセプターの内在性アゴニスト（例えばエストロゲン）が分泌される時期や条件等の生体内動態を可視化分析することも可能となる。

さらに、第10の発明では、既知のアゴニストの存在下で、アゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブと、過剰量のアンタゴニスト候補物質を共存させ、アンタゴニスト候補物質非共存下および共存下におけるシグナルの変化を測定することにより、簡便に、精度高く、該候補物質が核内レセプターに対するアンタゴニストとして作用するか否かをスクリーニングできる。

また、第11の発明では、アゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブを発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入し、細胞内で、プローブ、既知のアゴニス

ト、および候補物質を共存させることにより、候補物質がアンタゴニストとして作用するか否かを *in vivo* で判別することが可能となる。

さらに、第12の発明では、アゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブを発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入し、非ヒト動物全能性細胞を個体発生することによって、この動物またはその子孫動物（第13の発明）の全細胞においてプローブと既知のアゴニストとアンタゴニスト候補物質を共存させることができる。これにより、該候補物質が核内レセプターに対するアンタゴニストとして作用するか否かを判別できると共に、この非ヒト動物の生命活動や疾患に対するアンタゴニスト候補物質の影響や効果をモニターすることも可能となる。

以下、実施例を示し、この発明の実施の形態についてさらに詳しく説明する。もちろん、この発明は以下の例に限定されるものではなく、細部については様々な態様が可能であることは言うまでもない。

## 実施例

### <準備>

#### (1) 材料

Ham's F-12 培地、ウシ胎児血清 (FCS)、Hank's バランス電解液 (HBSS)、およびリポフェクタミン 2000 試薬は Life Technologies (Rockville, MD) より購入した。

ダルベッコ修飾イーグル培地 (DMEM)、トリプシン-EDTA、E2、DES、OHT、Gen は Sigma Chemicals Co. (St. Louis, MO) より購入した。

抗 GFP 抗体は Clontech (Palo Alto, CA) より入手した。

クローニング用酵素は全て Takara Biomedical (東京、日本) から入手した。

hER $\alpha$ cDNA プラスミドは American Type Culture Collection (ATCC, VA, USA) より購入した。

哺乳類発現ベクター pcDNA3.1(+) は Invitrogen Co. (Carlsbad, CA) より入手した。

Bis-A、NP、ICI 182,780 は WAKO Pure Chemicals Industries Ltd (大阪、日本) より入手した。

その他の試薬は分析試薬グレード品を使用した。

## (2) プラスミド構築

### (A) エストロゲンレセプターのアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ

標準的なポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) により ECFP (配列番号 3) (1-238aa)、EYFP (配列番号 4) (1-238aa)、ヒトエストロゲンレセプター  $\alpha$  LBD (配列番号 5) (305-550aa) (以下、Er  $\alpha$ -LBD とする)、屈曲性リンカー (GGNGG) (配列番号 6)、およびステロイドレセプター活性化補助因子 1 NR ボックス II (配列番号 2) (687-697aa) のフラグメント cDNA を産生し、Kozak 配列 (図中で Kz と表記) と制限部位を連結して図 2 A に示される構成を構築した。

これより、ステロイドレセプター活性化補助因子 1 (SRC-1) の活性化補助因子ペプチド (配列番号 2) (非特許文献 23~25) が、短い可動性のリンカー (配列番号 3) を介して ER  $\alpha$  LBD に連結され、この融合蛋白質が 2 種類の異なる蛍光波長を有する蛍光蛋白質、すなわち CFP (ドナー) と YFP (アクセプター) に挟まれた、アゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブを得た。

なお、PCR フラグメントの配列は、ABI310 ジェネティック・アナライザーを用いて決定した。

この cDNA を、哺乳類発現ベクター pcDNA3.1 (+) の HindIII と XhoI 部位に挿入した。

### (B) ペルオキシソーム増殖因子活性化レセプターのアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ

上記 (A) エストロゲンレセプターの場合とほぼ同様の手順で、プラスミドを構築した。すなわち、標準的なポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) により ECFP (配列番号 3) (1-238aa)、EYFP (配列番号 4) (1-238aa)、ペルオキシソーム増殖因子活性化レセプター  $\gamma$  LBD (配列番号 8) (235-505aa) (以下、PPAR  $\gamma$ -LBD とする)、屈曲性リンカー (GGNGG)<sub>6</sub> (配列番号 9)、およびステロイドレセプター活性化補助因子 1 NR ボックス II (配列番号 2) (687-697aa) のフラグメント cDNA を産生

し、Kozak 配列（図中で Kz と表記）と制限部位を連結して図 2 B に示される構成を構築した。

これより、ステロイドレセプター活性化補助因子 1 (SRC-1) の活性化補助因子ペプチド（配列番号 2）（非特許文献 23～25）が、短い可動性のリンカー（配列番号 3）を介して PPAR $\gamma$ -LBD に連結され、この融合蛋白質が 2 種類の異なる蛍光波長を有する蛍光蛋白質、すなわち CFP（ドナー）と YFP（アクセプター）に挟まれた、アゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブを得た。

なお、PCR フラグメントの配列は、ABI310 ジェネティック・アナライザーを用いて決定した。

この cDNA を、哺乳類発現ベクター pcDNA3.1 (+) の HindIII と XhoI 部位に挿入した。

#### （C）アンドロゲンのアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ

上記（A）エストロゲンレセプターや（B）ペルオキシソーム増殖因子活性化レセプターの場合とほぼ同様の手順で、プラスミドを構築した。すなわち、標準的なポリメラーゼ連鎖反応（PCR）により ECFP（配列番号 3）（1-238aa）、EYFP（配列番号 4）（1-238aa）、ヒトアンドロゲンレセプター-LBD（配列番号 10）（672-910aa）（以下、AR-LBD とする）、屈曲性リンカー（GGNGG）<sub>3</sub>（配列番号 11）およびステロイドレセプター活性化補助因子 1 NR ボックス II（配列番号 2）（687-697aa）のフラグメント cDNA を産生し、Kozak 配列（図中で Kz と表記）と制限部位を連結して図 2 C に示される構成を構築した。

これより、ステロイドレセプター活性化補助因子 1 (SRC-1) の活性化補助因子ペプチド（配列番号 2）（非特許文献 23～25）が、短い可動性のリンカー（配列番号 3）を介して AR-LBD に連結され、この融合蛋白質が 2 種類の異なる蛍光波長を有する蛍光蛋白質、すなわち CFP（ドナー）と YFP（アクセプター）に挟まれた、アゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブを得た。

なお、PCR フラグメントの配列は、ABI310 ジェネティック・アナライザーを用いて決定した。



この cDNA を、哺乳類発現ベクター pcDNA3.1 (+) の HindIII と XhoI 部位に挿入した。

### (3) 細胞培養と形質移入

各細胞を、10 %ウシ胎児血清 (FCS) を添加した Ham's F-12 培地培地、ならびに 10 % FCS、1.0 mM ビルビン酸ナトリウム、0.1 mM 非必須アミノ酸を添加したダルベッコ修飾イーグル培地中にて、それぞれ 5% CO<sub>2</sub> 下、37℃で培養した。細胞の形質移入は、リポフェクタミン 2000 試薬の存在下、ガラス底シャーレ中で、プローブを含む発現ベクター pcDNA3.1 (+) を用いて行った。

なお、使用した細胞は、エストロゲンレセプターのアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブではチャイニーズハムスター卵巣 (CHO-K1) 細胞を、ペルオキシソーム増殖因子活性化レセプターのアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブでも CHO-K1 細胞を、アンドロゲンレセプターのアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブではブタ腎臓 (PK-15) 細胞を使用した。

細胞は、形質移入から 12~24 時間後に画像処理可能な状態となった。

### (4) 蛋白質発現のイムノブロット分析

図 2 A~図 2 C に示される各プローブをエンコードしている発現ベクター pcDNA3.1 (+) を用いて形質移入した細胞破碎液 (CHO-K1 または PK-15) を、10 %ポリアクリルアミドゲル電気泳動による SDS-PAGE に供し、電気泳動によりニトロセルロース膜上に転写した。

この膜は、まず抗 GFP 抗体 (1%スキムミルク含有 TBST 溶液 (組成: 50mM Tris-HCl pH8.0、150mM NaCl、0.05% Tween 20) で 1:500 希釈) を用いて、続いてアルカリホスファターゼ標識抗ウサギ抗体 (1%スキムミルク含有 TBST 溶液で 1:5000 希釈) を用いて可視化した。

蛋白質の発現量は、イメージアナライザ (LAS-1000 plus, Fujifilm CO., 東京、日本) により定量した。

### (5) 細胞の画像処理

画像処理に先立ち、培地を Hank's バランス電解液に置き換えた。細胞の画像処理は CarlZeiss Axiovert 135 顕微鏡上で、MetaFluor (Universal Imaging, W

est Chester, PA) でコントロールされた冷却電荷結合素子カメラ MicroMAX (Roper Scientific Inc, Tucson, AZ) を用いて、形質移入後 12~24 時間以内に室温条件で実施した。

440±10 nm 励起時の露出時間は、100 ms であった。蛍光画像の取得は 40×油浸対物レンズ (Carl Zeiss, Jena, Germany) を用い、480±15 nm ならびに 535±12.5 nm のフィルターを介して行った。

#### <実施例 1> アゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブの応答性評価

##### (1) エストロゲンレセプターのアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ

(1-1) エストロゲンの中で最も強力な活性を示すことで知られる 17 $\beta$  エストラジオール (E2) をアゴニストとし、アゴニスト刺激に対するプローブの応答性を評価した。

まず、プローブ (図 2 A-a) を発現させた CHO-K1 細胞を 100 nM E2 で刺激し、FRET 変化の経時変化を観察した。図 3 A に、E2 刺激前と刺激後の細胞画像を示した。なお、図 3 A においては、480/535 nm の蛍光強度比が疑似カラー画像として示されている。

図 3 A より、100 nM E2 刺激による疑似カラーのブルーシフトが観察された。これは、CFP/YFP 蛍光強度比の減少 (FRET の増加) を表している。

蛍光強度比の減少は、E2 添加後数秒以内に検出され、1000 秒以内にプラトーに達した (図 4 A-a)。一方、E2 を添加しないこと以外は同一条件で FRET 変化の経時変化を観察したところ、有意な変化は見られなかった (図 4 A-b)。

(1-2) 次に、このような FRET の増加が E2 によるリガンド認識部位 (ER  $\alpha$  LBD) と結合応答部位 (LXXLL モチーフ) の相互作用により引き起こされていることを確認するため、LXXLL モチーフの疎水性ロイシン (L) 残基を全てアラニン (A) 残基に置換した (配列番号 7) 変異プローブを作成した (図 2 A-b)。

図 4 c に示されるように、変異プローブを発現させた CHO-K1 細胞では、E2 刺激による CFP/YFP 蛍光強度比の有意な変化は見られなかった。

したがって、FRET の変化は、アゴニスト刺激の結果、アゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブにおけるリガンド認識部位 (ER  $\alpha$  LBD) に結合応答部位 (LXX

LL モチーフ) が結合したことによるものであることが確認された。

また、従来報告されているように (非特許文献 5、23~25)、ER $\alpha$ LBD の活性化補助因子結合ドメインに対する相互作用に LXXLL モチーフの疎水性ロイシン残基が重要な役割を果たすことも確認された。

(1-3) 次に、E2/ER $\alpha$ LBD 複合体の X 線結晶解析を行ったところ、E2 は ER $\alpha$ LBD に存在する疎水性リガンド結合ポケット (容積 450 Å<sup>3</sup>; E2 の分子容 (245 Å<sup>3</sup>) の約 2 倍) で包接されており、低エネルギー立体構造を取っていることが明らかになった (非特許文献 32)。

ヘリックス 12 は、リガンド結合ポケットの上に位置し、これにより疎水性 LXXLL モチーフの取り込みと相互作用を可能とする疎水性の溝が形成されている。また、このような溝は、LXXLL モチーフの 3 つのロイシン残基の側鎖と ER $\alpha$ LBD 側鎖の Met 543、Lys 362、Glu 542 残基との間に生じるファン・デル・ワールス接触により安定化されている (非特許文献 33)。

これより、プローブにおけるリガンド認識部位 (ER $\alpha$ LBD) と結合応答部位 (LXXLL モチーフ) の相互作用により、CFP と YFP が近接し、その結果 FRET が生じることが確認された。

(2) ペルオキシソーム増殖因子活性化レセプターのアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ

(2-1) 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J<sub>2</sub> (15d-PGJ<sub>2</sub>) を内在性アゴニストとし、アゴニスト刺激に対するプローブの応答性を評価した。また、抗糖尿病薬のピオグリタゾン (pioglitazone) に対するプローブの応答性も評価した。

まず、プローブ (図 2 B) を発現させた CHO-K1 細胞を 10  $\mu$ M 15d-PGJ<sub>2</sub> で刺激し、FRET 変化の経時変化を観察した。

CFP/YFP (480/535 nm) の蛍光強度比の減少 (FRET の増加) は、15d-PGJ<sub>2</sub> 添加後 400 秒以内に検出され、1000 秒以内にプラトーに達した (図 4 B-a)。また、図 4 B-b に、15d-PGJ<sub>2</sub> の濃度と蛍光強度比変化の値の関係 (反応曲線) を示した。

(2-2) また、上記と同様に、プローブ (図 2 B) を発現させた CHO-K1 細胞を 1.0  $\mu$ M pioglitazone で刺激した場合の FRET 変化の経時変化も観察した。

CFP/YFP (480/535 nm) の蛍光強度比の減少 (FRET の増加) は、pioglitazone 添加後 100 秒以内に検出され、100 秒を過ぎたあたりからプラトーに達した (図 4 C-a)。また、また、図 4 C-b に、pioglitazone の濃度と蛍光強度比変化の値の関係 (反応曲線) を示した。

(3) アンドロゲンレセプターのアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ

(3-1)  $5\alpha$ -dihydrotestosterone (DHT) をアゴニストとし、アゴニスト刺激に対するプローブの応答性を評価した。

まず、プローブ (図 2 C-a) を発現させた PK-15 細胞を 100 nM DHT で刺激し、FRET 変化の経時変化を観察した。図 3 B に、DHT 刺激前と刺激後の細胞画像を示した。なお、図 3 B においては、480/535 nm の蛍光強度比が疑似カラー画像として示されている。

図 3 B より、100 nM DHT 刺激による疑似カラーのブルーシフトが観察された。これは、CFP/YFP 蛍光強度比の減少 (FRET の増加) を表している。

蛍光強度比の減少は、DHT 添加後数秒以内に検出され、1200 秒以内にプラトーに達した (図 4 D-a)。一方、DHT を添加しないこと以外は同一条件で FRET 変化の経時変化を観察したところ、有意な変化は見られなかった (図 4 D-b)。

(3-2) 次に、このような FRET の増加が、DHT によるリガンド認識部位 (AR-LBD) と結合応答部位 (LXXLL モチーフ) の相互作用により引き起こされていることを確認するため、LXXLL モチーフの疎水性ロイシン (L) 残基を全てアラニン (A) 残基に置換した (配列番号 7)、変異プローブを作成した (図 2 B-b)。

図 4 D-c に示されるように、変異プローブを発現させた PK-15 細胞では、DHT 刺激による CFP/YFP 蛍光強度比の有意な変化は見られなかった。

したがって、FRET の変化はアゴニスト刺激の結果、上記エストロゲンレセプターのアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブの結果と同様に、アゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブにおけるリガンド認識部位 (AR-LBD) に結合応答部位 (LXXLL モチーフ) が結合したことによるものであることが確認された。

<実施例 2> アゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブを用いた外来性アゴニストのスクリーニング

(1) エストロゲンレセプターのアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ

CHO-K1 細胞内でプローブを発現させ、DES、Gen、Bis-A および NP の外来性エストロゲンについて、エストロゲン様活性の誘発能力を評価した。

なお、物質の濃度は、 $1.0 \times 10^{-4}$  M から  $1.0 \times 10^{-11}$  M の範囲とした。

図 5 A に各物質の濃度と蛍光強度比変化の値の関係（反応曲線）を示した。

図 5 A から、各物質の  $EC_{50}$ （リガンド認識部位 (ER  $\alpha$  LBD) と結合応答部位 (LXXLL モチーフ) の反応が 50 % 起こるために必要な物質濃度) 値を求めたところ、E2、DES、Gen、NP および Bis-A について、各々  $0.8 \times 10^{-8}$  M、 $1.3 \times 10^{-8}$  M、 $6.5 \times 10^{-8}$  M、 $0.26 \times 10^{-6}$  M、 $0.42 \times 10^{-6}$  M を得た。これらの  $EC_{50}$  値を、相対取り込み能力 (RRA ; 非特許文献 3 4) に変換し、各物質が結合応答部位のリガンド認識部位への取り込みを促進する相対的能力を比較した。

なお、RRA は以下の式により算出した。

$$RRA = (\text{E2 濃度 [50 \% 反応]} / \text{EDC 濃度 [50 \% 反応]}) \times 100$$

実施例 1 において使用したエストロゲン E2 の RRA 値は任意に 100 とした。E2、DES、Gen、NP、Bis-A の RRA 値は各々 100、60、12、3.0、1.9 として得られた。

したがって、これらの物質が、結合応答部位のリガンド認識部位への取り込みを促進する能力は、 $E2 > DES > Gen > NP > Bis-A$  であることが明らかになった。

以上より、各物質の FRET 応答の違いは、外来性アゴニストがプローブ内の ER  $\alpha$  LBD の立体構造をリガンド特異的に変化させ、LXXLL モチーフを取り込めるようにする「強さ」を反映していることが確認された。

E2 は ER に結合することにより、ER の三次構造における立体配座の変化を誘導する。このような立体配座の変化により、ER のリガンド結合ドメインは、活性化補助因子を取り込み、その結果として基本転写機構の構築を媒介するような位置に配置されるようになる（非特許文献 4、5）。

しかし、実際の立体構造変化、すなわち外来性エストロゲンが誘導する ER におけるヘリックス 12 の再配置は、各物質の立体的および静電的性質の違いに影響され、E2 の場合と異なる可能性がある（非特許文献 2 4、2 5、3 5、3 6）。

なお、Routledge et al. は、GST プルダウンアッセイを用いて、前記の各物質

について、ER (と活性化補助因子蛋白質の会合を促進する能力を求め、同様の結果を得ている (非特許文献 3 4)。

## (2) アンドロゲンレセプターのアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ

PK-15 細胞内でプローブを発現させ、アンドロゲンのアゴニストである DHT、アンドロゲンのアンタゴニストであるテストテロン、プロゲステロンおよびコルチゾールについて、アンドロゲン様活性の誘発能力を評価した。

なお、これら物質の濃度は、 $1.0 \times 10^{-4}$  M から  $1.0 \times 10^{-11}$  M の範囲とした。

図 5 B に各物質の濃度と蛍光強度比変化の値の関係 (反応曲線) を示した。

図 5 B から、各物質の  $EC_{50}$  (リガンド認識部位 (AR-LBD) と結合応答部位 (LXXLL モチーフ) の反応が 50 % 起こるために必要な物質濃度) 値を求めたところ、DHT、テストテロンおよびプロゲステロンについては、各々  $1.1 \times 10^{-9}$  M、 $1.7 \times 10^{-8}$  M、 $4.7 \times 10^{-7}$  M を得、コルチゾールについては反応を示さなかった。

FRET 変化は、テストテロンの濃度が DHT の 10 倍濃度を供することで、DHT の FRET 変化と同じ度合いを示した。その一方で、プロゲステロンの場合では、濃度を上げて DHT やテストテロンの FRET 変化と同じ程度の度合いを示すことはなかった。

図 5 B に示した結果から、このような各物質の FRET 応答の違いは、これら各物質が AR-LBD の立体構造をリガンド特異的に変化させるには、プローブ内の活性化補助因子を取り込む「強さ」に反映していることが確認された。

## <実施例 3> アゴニストとアンタゴニストの識別

### (1) エストロゲンレセプターのアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ

(1-1) プローブを発現させた CHO-K1 細胞を、E2 ならびにエストロゲンレセプターのアンタゴニストとして知られている ICI 182,780 および OHT (それぞれ  $1.0 \mu\text{M}$ ) により刺激し、FRET 応答の変化をモニターした。

E2 刺激により FRET の大幅な増大が見られた (図 6-a) が、ICI 182,780 と OHT では FRET の顕著な増大は見られなかった (図 6-b、-c)。

(1-2) 次に、E2 が、リガンド認識部位に結合した ICI 182,780 および OHT

を置換する能力を検討した。

プローブを発現させた CHO-K1 細胞を含む 3 つの異なるガラス底シャーレに、1.0  $\mu\text{M}$  の ICI 182,780 を添加し、室温で 15 分間インキュベートした。その後、ICI 182,780 を洗浄除去することなく、1 番目、2 番目、3 番目のシャーレにそれぞれ 1.0  $\mu\text{M}$ 、10  $\mu\text{M}$ 、100  $\mu\text{M}$  の E2 を添加し、FRET 応答の変化をモニターした。

1.0  $\mu\text{M}$  の ICI 182,780 が存在する条件で、1.0  $\mu\text{M}$  と 10  $\mu\text{M}$  の E2 を添加した場合には、FRET の変化は観察されなかったものの (図 6-d、-e)、E2 の濃度を 100  $\mu\text{M}$  とした場合には FRET レベルの変化が見られた (図 6-f)。しかし、この変化は 1.0  $\mu\text{M}$  の E2 のみで生じる FRET 変化の 40 %ほどであった。

同様に、1.0  $\mu\text{M}$  の OHT が存在する条件で 1.0  $\mu\text{M}$ 、10  $\mu\text{M}$ 、100  $\mu\text{M}$  の E2 を添加した場合には、FRET 応答の増大は、それぞれ、1.0  $\mu\text{M}$  の E2 単独で生じる変化の 40 %、65 %、90 %であった (図 6-g、-h、-i)。

以上結果から、E2 (アゴニスト) は、生細胞中でプローブにおけるリガンド認識部位 (ER  $\alpha$  LBD) と結合応答部位 (LXXLL モチーフ) の相互作用を促進するが、ICI 182,780 と OHT (アンタゴニスト) はこのような相互作用を阻害することが確認された。さらに、相互作用のアンタゴニストによる阻害は、アゴニストの濃度を 100 倍高濃度にしても完全に回復しないことが示された。

したがって、アゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブがアゴニストの存在下で発信するシグナルが、アンタゴニストの共存により妨害されることが確認された。

(1-3) 以上の結果を、アゴニストとアンタゴニストが存在する状態での ER  $\alpha$  LBD の X 線結晶解析結果 (非特許文献 32 および 33) と比較した。

アゴニストが結合した場合には、リガンド結合ドメインの立体構造変化が誘導され、同時にリガンド結合ポケット上に H12 が配置されるため、リガンド結合ドメイン表面上にある活性化補助因子結合ドメインが曝露される。

一方、アンタゴニストは、塩基性の嵩高い側鎖とヘリックス 12 の間に直接的な立体効果を及ぼすことにより、ヘリックス 12 が適切な配座を取ることを阻害する。そのため、活性化補助因子結合ドメインが正しく形成されず、リガンド結

合ドメイン（上記の実施例においては、ER $\alpha$ LBD）が活性化補助因子の核内レセプター相互作用ドメイン（上記の実施例においては、LXXLL モチーフ）と相互作用できなくなる。

以上より、アゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブにおける CFP から YFP へのエネルギー転移は、アゴニスト（E2）存在下では起こるが、アンタゴニスト（ICI 182,780 と OHT）の存在下ではブロックされることが示された。

したがって、アゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブを用いて、各種の候補物質存在下におけるリガンド認識部位による結合応答部位の取り込み能を測定することにより、アゴニストとアンタゴニストを選択的に判別できることが確認された。

## （2）ペルオキシソーム増殖因子活性化レセプターのアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ

プローブを発現させた CHO-K1 細胞を、ペルオキシソーム増殖因子活性化レセプターのアゴニストである、ビスフェノール A ジグリシジルエーテル（BADGE）10  $\mu$ M により刺激し、FRET 応答の変化をモニターした。

図 7 に示したように、BADGE を添加しても、蛍光強度比において大きな変化はなかった。

## （3）アンドロゲンレセプターのアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ

（3-1） プローブを発現させた PK-15 細胞を、DHT（1.0nM、10 nM および 100 nM）ならびにエストロゲンレセプターのアゴニストであるフルタミドおよびプロシミドン（procymidone）（それぞれ 10  $\mu$ M）により刺激し、FRET 応答の変化をモニターした。

図 8 に示したように、DHT 刺激により、濃度依存的に FRET の大幅な増大が見られたが、フルタミドおよびプロシミドン（それぞれ 100nM）では FRET の顕著な増大は見られなかった。

そして、DHT+フルタミドならびに DHT+プロシミドンについては、DHT の濃度依存的に増大した。



(3-2) また、プローブを発現させた PK-15 細胞を、フルタミド (1.0  $\mu\text{M}$ ) のみによる刺激およびフルタミド (10  $\mu\text{M}$ ) + テストテロン (100 nM) による刺激の FRET 応答の変化についても、モニターした。なお、フルタミド (1.0  $\mu\text{M}$ ) + テストテロン (100 nM) においては、まず、テストテロンを添加し、次にプラトーに達する前後のタイミングでフルタミドを添加した。

フルタミド (1.0  $\mu\text{M}$ ) のみによる刺激は、図 9 A に示したように、反応は特に示さなかった。一方、フルタミド (10  $\mu\text{M}$ ) + テストテロン (100 nM) による刺激は、テストテロンの添加直後には、蛍光強度比が減少し、およそ 3000 秒でプラトーに達した。しかし、このときにフルタミドを添加すると、蛍光強度比は増加する傾向を示した。

#### 産業上の利用可能性

以上詳しく説明したとおり、この発明によって、核内レセプターに対するアゴニストやアンタゴニストを選択的に検出、定量できるアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブが提供される。このようなアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブを用いることにより、特定の物質が、該核内レセプターに対するアゴニストとして作用するか、アンタゴニストとして作用するかを、迅速に、精度高く判定することが可能になる。したがって、内分泌攪乱物質や特定の疾患に対する医薬品の高性能スクリーニング方法が提供される。

### 請求の範囲

1. 少なくとも、核内レセプターのリガンド結合ドメインを含むリガンド認識部位と、該核内レセプターリガンド結合ドメインにおける活性化補助因子結合ドメインに特異的に結合するペプチド鎖を含む結合応答部位が、屈曲性のリンカーを介して連結されており、この「リガンド認識部位／リンカー／結合応答部位」融合構造の両末端に、互いの接近が検出可能な二つのマーカー部位が各々連結されていることを特徴とする核内レセプターのアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ。
2. リガンド認識部位は、グルココルチコイドレセプター、エストロゲンレセプター、プロゲステロンレセプター、ペルオキシソーム増殖因子活性化レセプター、アンドロゲンレセプター、甲状腺ホルモンレセプター、レチノイン酸レセプター、ビタミンDレセプター、およびオーファンレセプターからなる群より選択されるいずれかの核内レセプターのリガンド結合ドメインを含むものである請求項1のアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ。
3. リガンド認識部位は、エストロゲンレセプター $\alpha$ リガンド結合ドメイン、ペルオキシソーム増殖因子活性化レセプターリガンド結合ドメインまたはアンドロゲンレセプターリガンド結合ドメインである請求項1のアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ。
4. 結合応答部位は、ステロイドレセプター活性化補助因子1の核内レセプター相互作用ドメインペプチドである請求項3のアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ。
5. 結合応答部位は、配列番号1のモチーフを含むものである請求項3のアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ。
6. 互いの接近が検出可能な二つのマーカー部位は、黄色蛍光タンパク質とシアン蛍光タンパク質である請求項1ないし5のいずれかのアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ。
7. 核内レセプターに対するアゴニストをスクリーニングするための方法であって、請求項1ないし6のいずれかのアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ

ブとアゴニスト候補物質を共存させ、アゴニスト候補物質非存在下および存在下におけるシグナルの変化を測定するアゴニストのスクリーニング方法。

8. 請求項1ないし6のいずれかのアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブを発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入し、細胞内で該プローブとアゴニスト候補物質を共存させる請求項7のアゴニストのスクリーニング方法。

9. 請求項1ないし6のいずれかのアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブを発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入し、非ヒト動物全能性細胞を個体発生することによって、この動物またはその子孫動物の全細胞において、該プローブとアゴニスト候補物質を共存させる請求項7のアゴニストのスクリーニング方法。

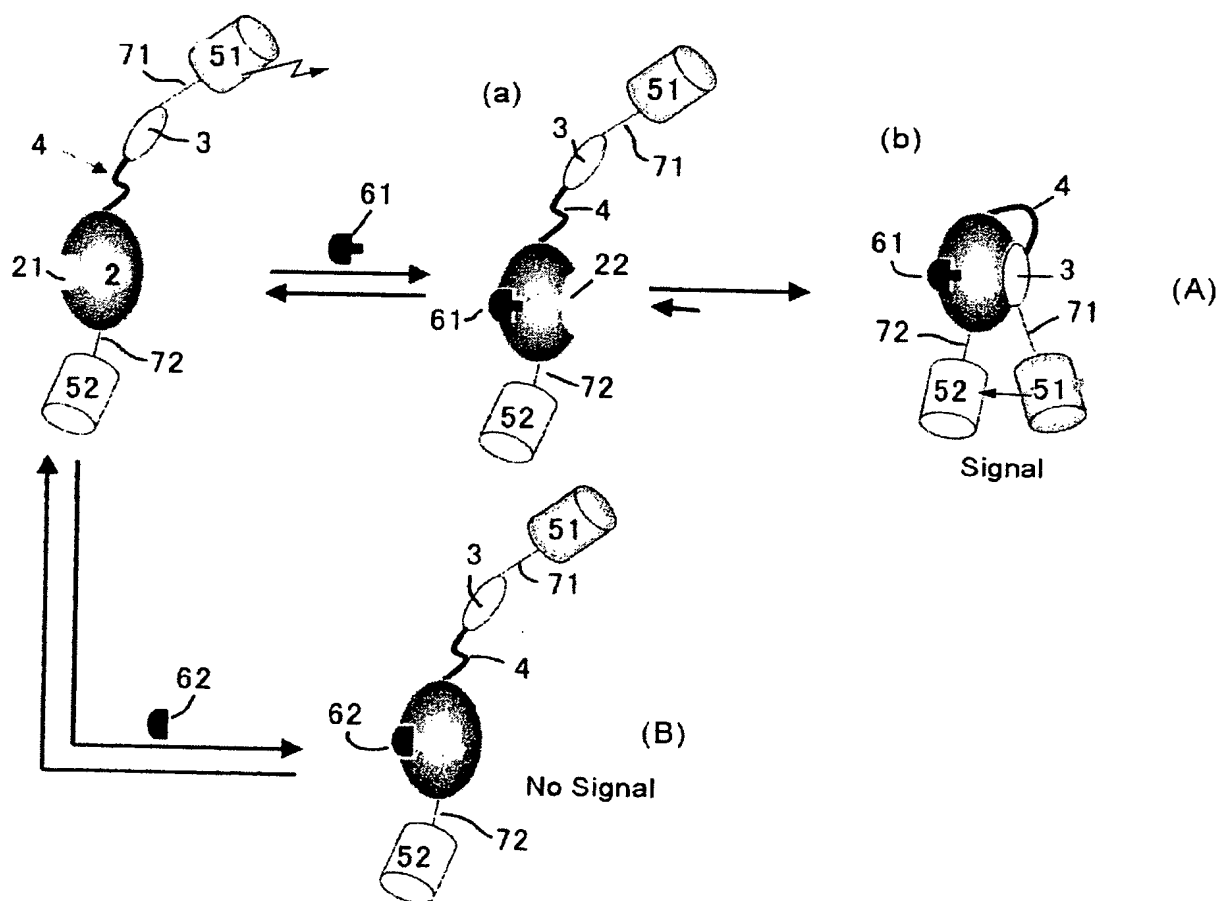
10. 核内レセプターに結合し、拮抗作用を示すアンタゴニストをスクリーニングするための方法であって、既知のアゴニストの存在下で、請求項1ないし6のいずれかのアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブと過剰量のアンタゴニスト候補物質を共存させ、アンタゴニスト候補物質非存在下および存在下におけるシグナルの変化を測定するアンタゴニストのスクリーニング方法。

11. 請求項1ないし6のいずれかのアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブを発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入し、細胞内で、該プローブと既知のアゴニストとアンタゴニスト候補物質を共存させる請求項10のアンタゴニストのスクリーニング方法。

12. 請求項1ないし6のいずれかのアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブを発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入し、非ヒト動物全能性細胞を個体発生することによって、この動物またはその子孫動物の全細胞において、該プローブと既知のアゴニストとアンタゴニスト候補物質を共存させる請求項10のアンタゴニストのスクリーニング方法。

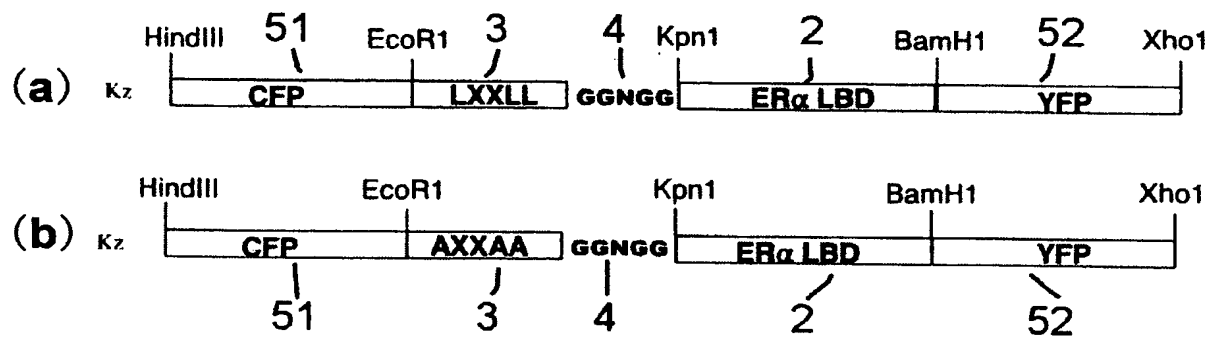
13. 請求項1ないし6のいずれかのアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブを発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入し、非ヒト動物全能性細胞を個体発生することによって得られる非ヒト動物またはその子孫動物。

図 1

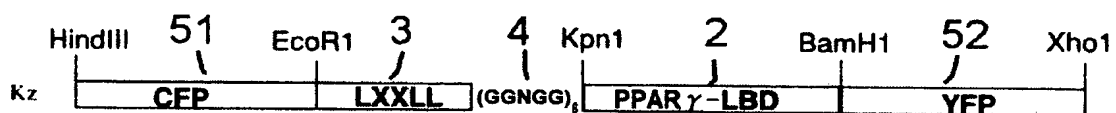


## 図2

A



B



C

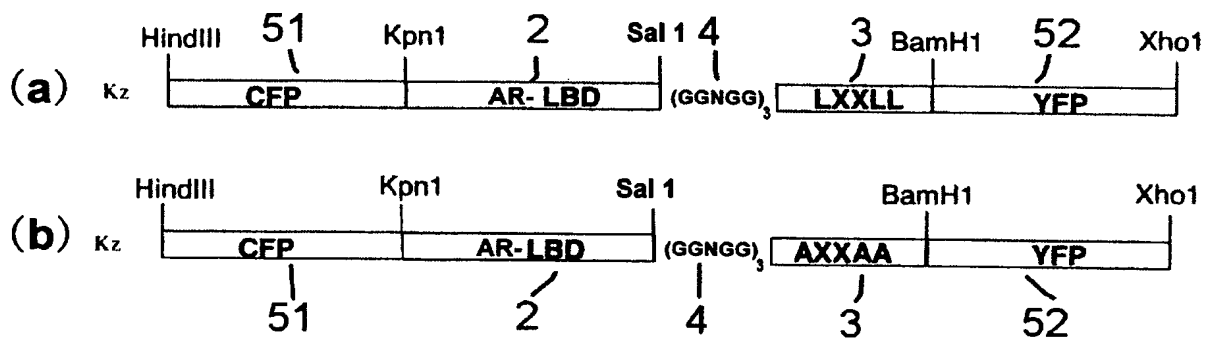


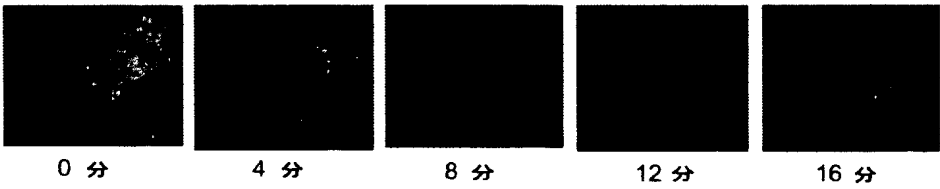
図3

A



蛍光強度比 CFP/YFP 0.3 1.8

B



蛍光強度比 CFP/YFP 0.8 1.5

図4

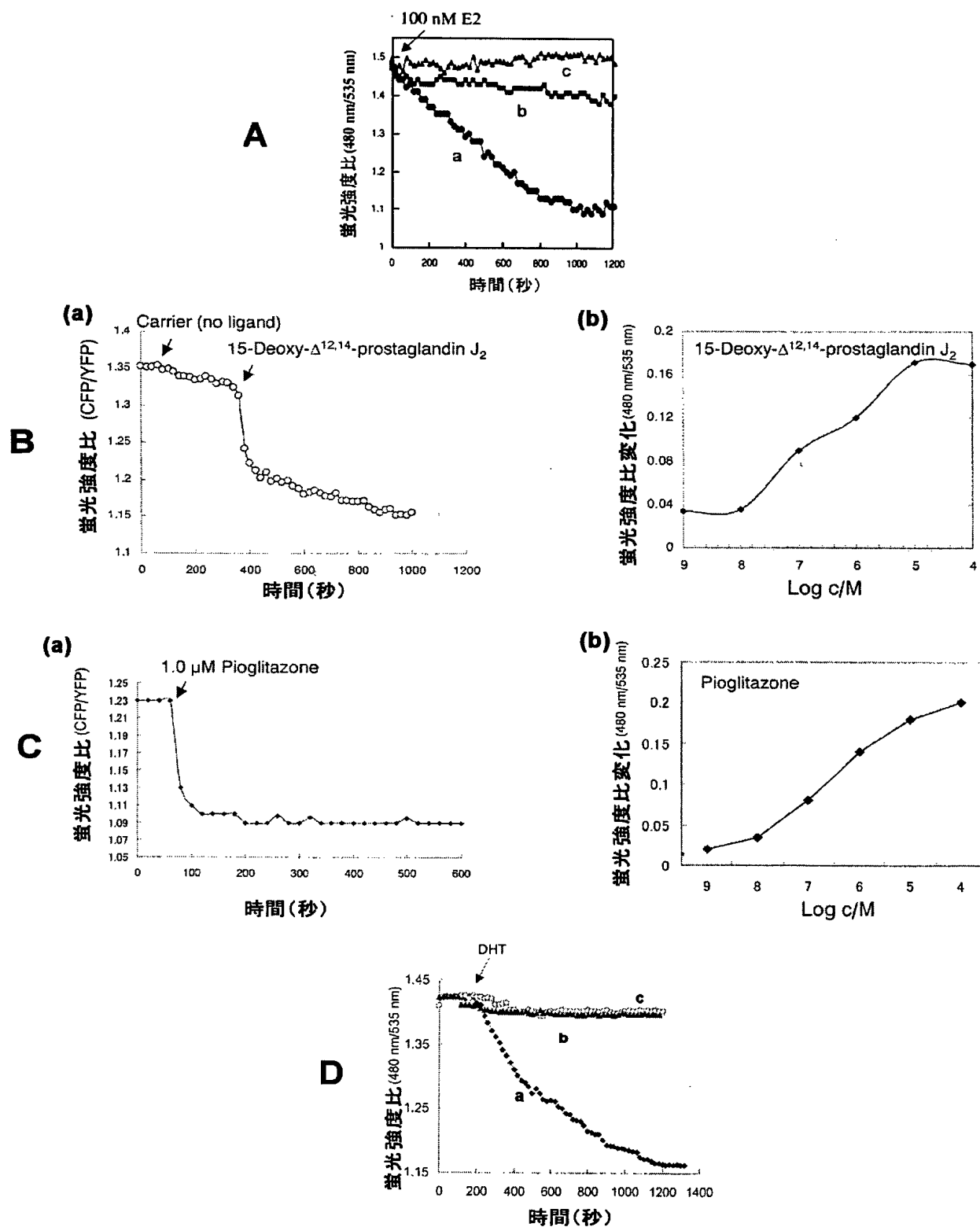


図5

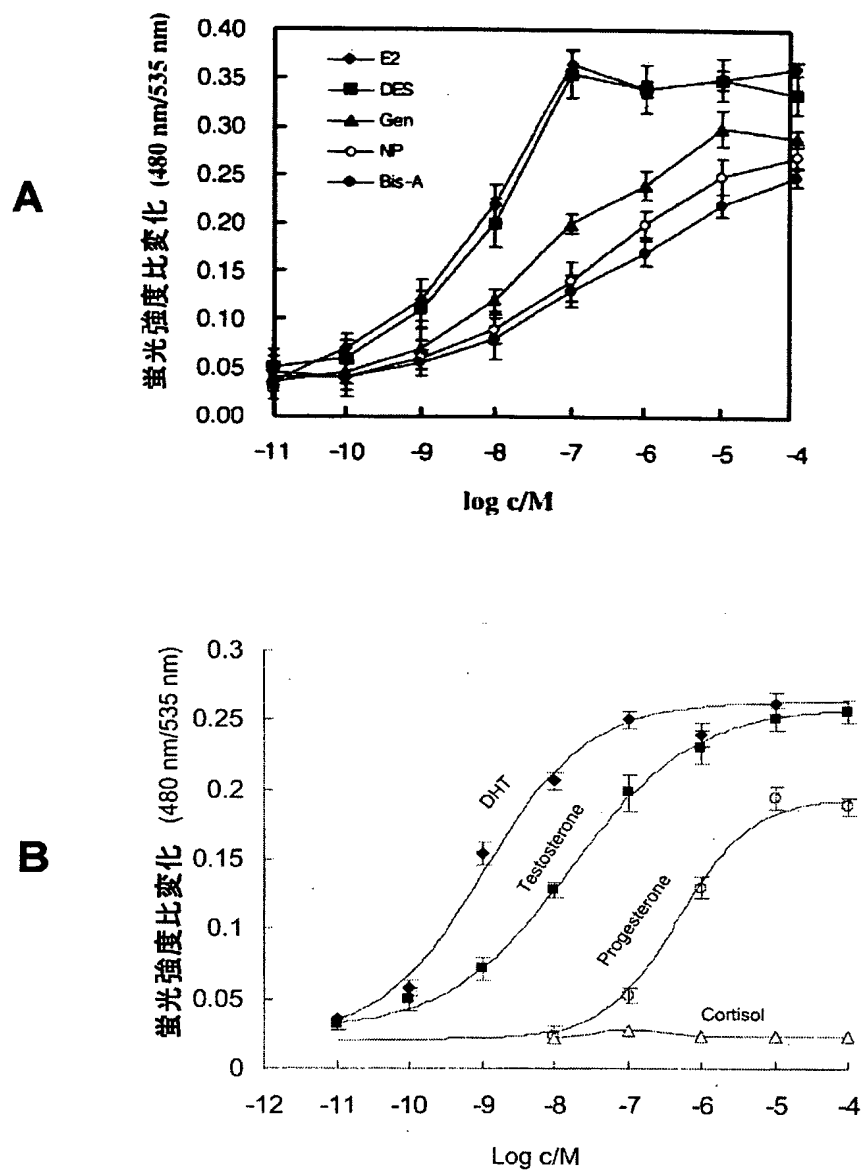




図 6

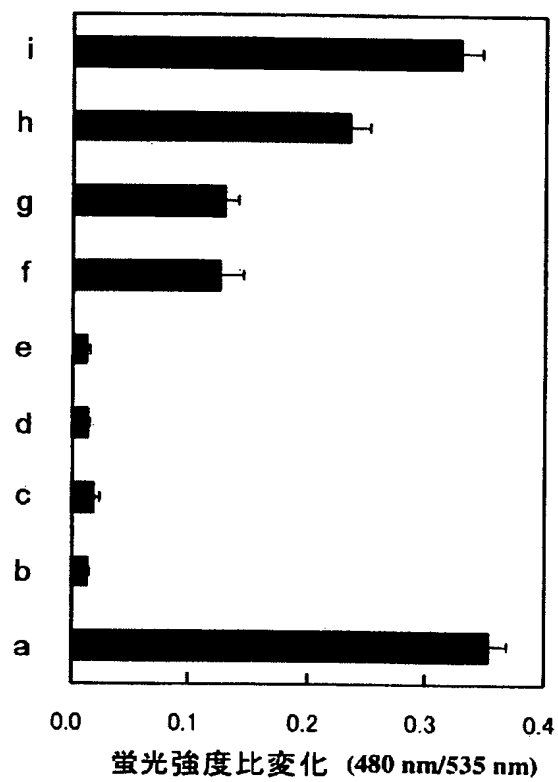


図7

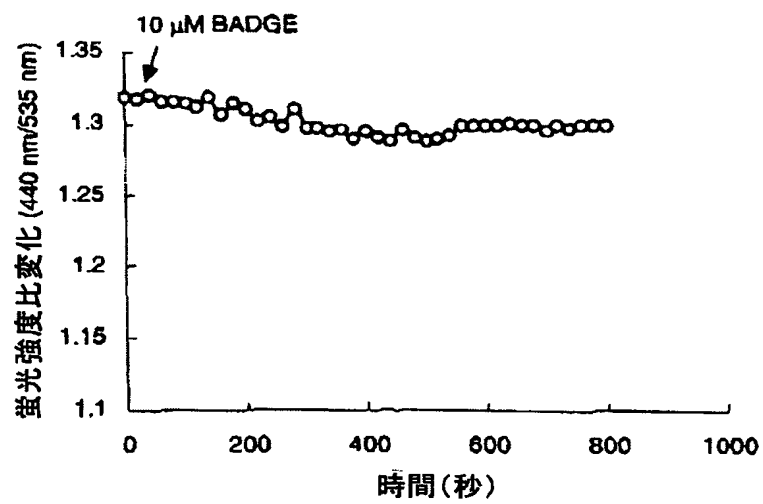


図 8

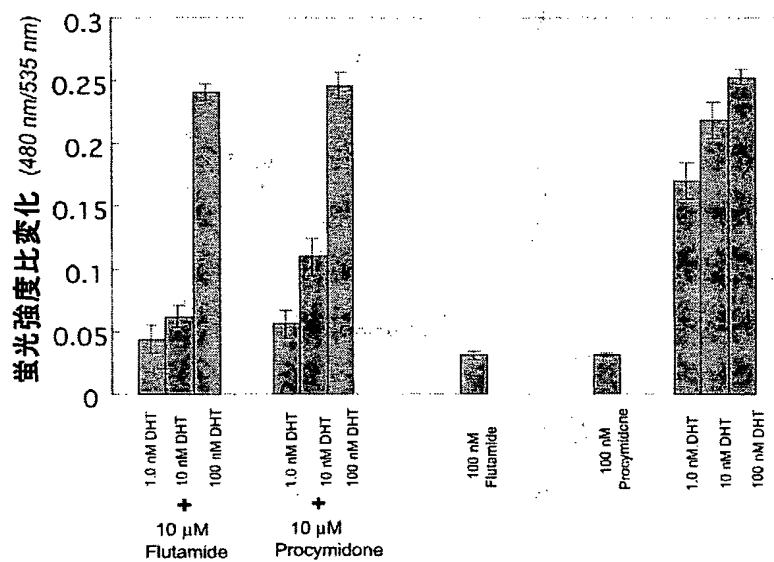
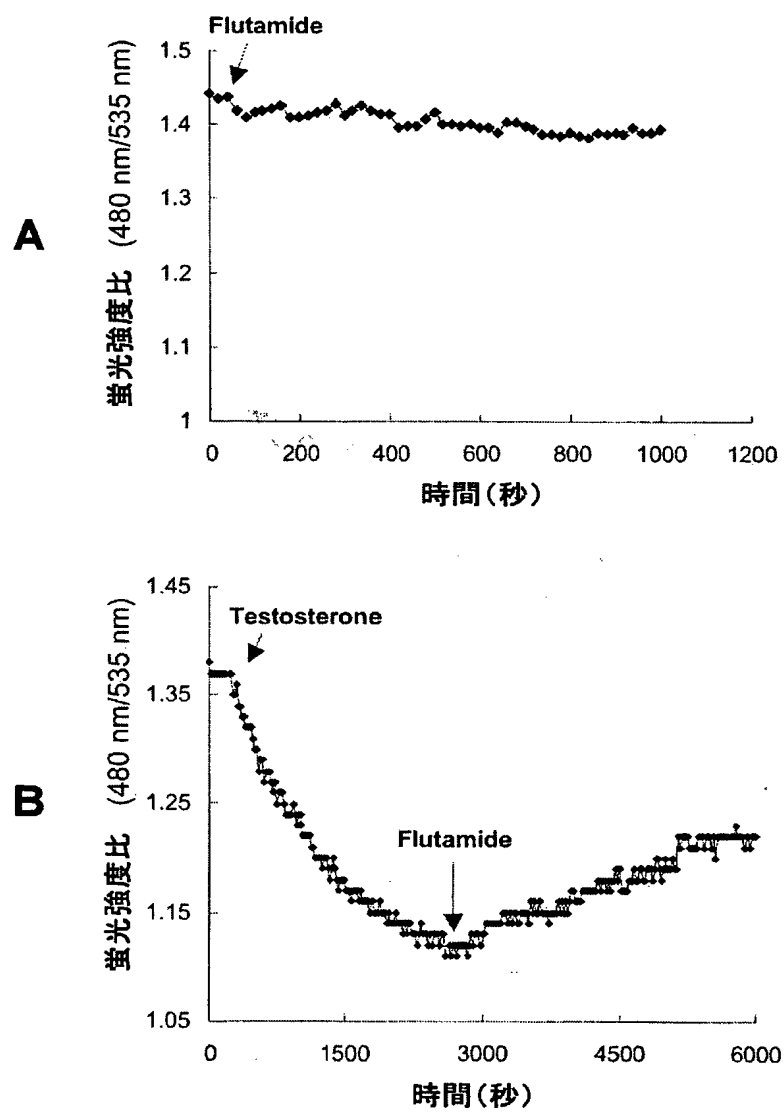


図9



## SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Agency

<120> Probe for detection of nuclear receptor agonist/antagonist and  
method for screening agonist and antagonist using the same

<130> 04F055PCT

<150> JP 2004-35678

<151> 2004-02-12

<160> 11

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> any amino acid

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (2).. (3)

<223> any amino acid

<400> 1

Leu Xaa Xaa Leu Leu

1 5

<210> 2

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<300>

<308> GeneBank/NP\_671766

<309> 2003-12-22

<313> (687).. (697)

<400> 2

His Lys Ile Leu His Arg Leu Leu Gln Glu Gly

1 5 10

<210> 3

<211> 239

<212> PRT

<213> Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; synthesized polypeptide

&lt;300&gt;

&lt;308&gt; GeneBank/GAG11884

&lt;309&gt; 2003-05-21

&lt;313&gt; (1).. (238)

&lt;400&gt; 3

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu  
1 5 10 15

Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly  
20 25 30

Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile  
35 40 45

Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr  
50 55 60

Leu Thr Trp Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys

65

70

75

80

Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu

85

90

95

Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu

100

105

110

Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly

115

120

125

Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr

130

135

140

Asn Tyr Ile Ser His Asn Val Tyr Ile Thr Ala Asp Lys Gln Lys Asn

145

150

155

160

Gly Ile Lys Ala Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser

165

170

175

Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly



180

185

190

Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Tyr Gln Ser Ala Leu

195

200

205

Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe

210

215

220

Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys

225

230

235

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 248

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; unknown

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Artificial Sequence

&lt;300&gt;

&lt;308&gt; GeneBank/AAQ93355

&lt;309&gt; 2003-10-12

&lt;313&gt; (1).. (238)

&lt;400&gt; 4

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu

1 5 10 15

Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly

20 25 30

Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile

35 40 45

Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr

50 55 60

Phe Gly Tyr Gly Leu Gln Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys

65 70 75 80

Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu

85 90 95

Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu

100 105 110

Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly

115

120

125

Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr

130

135

140

Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn

145

150

155

160

Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser

165

170

175

Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly

180

185

190

Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Tyr Gln Ser Ala Leu

195

200

205

Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe

210

215

220

Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Ser  
225 230 235 240

Gly Leu Arg Ser Thr Gly Ser Arg  
245

<210> 5

<211> 246

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> part of a eucaryotic protein

<300>

<308> GeneBank/NP\_036821

<309> 2004-01-23

<313> (305).. (550)

<400> 5

His Thr Lys Lys Asn Ser Pro Ala Leu Ser Leu Thr Ala Asp Gln Met  
1 5 10 15

Val Ser Ala Leu Leu Asp Ala Glu Pro Pro Leu Ile Tyr Ser Glu Tyr  
20 25 30

Asp Pro Ser Arg Pro Phe Ser Glu Ala Ser Met Met Gly Leu Leu Thr  
35 40 45

Asn Leu Ala Asp Arg Glu Leu Val His Met Ile Asn Trp Ala Lys Arg  
50 55 60

Val Pro Gly Phe Gly Asp Leu Asn Leu His Asp Gln Val His Leu Leu  
65 70 75 80

Glu Cys Ala Trp Leu Glu Ile Leu Met Ile Gly Leu Val Trp Arg Ser  
85 90 95

Met Glu His Pro Gly Lys Leu Leu Phe Ala Pro Asn Leu Leu Leu Asp  
100 105 110

Arg Asn Gln Gly Lys Cys Val Glu Gly Met Val Glu Ile Phe Asp Met  
115 120 125

Leu Leu Ala Thr Ser Ser Arg Phe Arg Met Met Asn Leu Gln Gly Glu  
130 135 140

Glu Phe Val Cys Leu Lys Ser Ile Ile Leu Leu Asn Ser Gly Val Tyr  
145 150 155 160

Thr Phe Leu Ser Ser Thr Leu Lys Ser Leu Glu Glu Lys Asp His Ile  
165 170 175

His Arg Val Leu Asp Lys Ile Asn Asp Thr Leu Ile His Leu Met Ala  
180 185 190

Lys Ala Gly Leu Thr Leu Gln Gln Gln His Arg Arg Leu Ala Gln Leu  
195 200 205

Leu Leu Ile Leu Ser His Ile Arg His Met Ser Asn Lys Gly Met Glu  
210 215 220

His Leu Tyr Asn Met Lys Cys Lys Asn Val Val Pro Leu Tyr Asp Leu  
225 230 235 240

Leu Leu Glu Met Leu Asp

245

<210> 6

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized oligopeptide

<400> 6

Gly Gly Asn Gly Gly

1

5

<210> 7

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized oligopeptide

<400> 7

His Lys Ile Ala His Arg Ala Ala Gln Glu Gly  
1 5 10

<210> 8

<211> 271

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> part of a eucaryotic protein

<300>

<308> GenBank/NM\_015869

<309> 1996-11-04

<313> (235).. (505)

<400> 8

Glu Ser Ala Asp Leu Arg Ala Leu Ala Lys His Leu Tyr Asp Ser Tyr  
1 5 10 15

Ile Lys Ser Phe Pro Leu Thr Lys Ala Lys Ala Arg Ala Ile Leu Thr  
20 25 30



Gly Lys Thr Thr Asp Lys Ser Pro Phe Val Ile Tyr Asp Met Asn Ser  
35 40 45

Leu Met Met Gly Glu Asp Lys Ile Lys Phe Lys His Ile Thr Pro Leu  
50 55 60

Gln Glu Gln Ser Lys Glu Val Ala Ile Arg Ile Phe Gln Gly Cys Gln  
65 70 75 80

Phe Arg Ser Val Glu Ala Val Gln Glu Ile Thr Glu Tyr Ala Lys Ser  
85 90 95

Ile Pro Gly Phe Val Asn Leu Asp Leu Asn Asp Gln Val Thr Leu Leu  
100 105 110

Lys Tyr Gly Val His Glu Ile Ile Tyr Thr Met Leu Ala Ser Leu Met  
115 120 125

Asn Lys Asp Gly Val Leu Ile Ser Glu Gly Gln Gly Phe Met Thr Arg  
130 135 140

Glu Phe Leu Lys Ser Leu Arg Lys Pro Phe Gly Asp Phe Met Glu Pro  
145 150 155 160

Lys Phe Glu Phe Ala Val Lys Phe Asn Ala Leu Glu Leu Asp Asp Ser  
165 170 175

Asp Leu Ala Ile Phe Ile Ala Val Ile Ile Leu Ser Gly Asp Arg Pro  
180 185 190

Gly Leu Leu Asn Val Lys Pro Ile Glu Asp Ile Gln Asp Asn Leu Leu  
195 200 205

Gln Ala Leu Glu Leu Gln Leu Lys Leu Asn His Pro Glu Ser Ser Gln  
210 215 220

Leu Phe Ala Lys Leu Leu Gln Lys Met Thr Asp Leu Arg Gln Ile Val  
225 230 235 240

Thr Glu His Val Gln Leu Leu Gln Val Ile Lys Lys Thr Glu Thr Asp  
245 250 255

Met Ser Leu His Pro Leu Leu Gln Glu Ile Tyr Lys Asp Leu Tyr  
260 265 270

<210> 9

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized oligopeptide

<400> 9

Gly Gly Asn Gly Gly Gly Gly Asn Gly Gly Gly Gly Asn Gly Gly Gly  
1 5 10 15

Gly Asn Gly Gly Gly Gly Asn Gly Gly Gly Gly Asn Gly Gly  
20 25 30

<210> 10

<211> 239

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> part of a eucaryotic protein

&lt;300&gt;

&lt;308&gt; GenBank/M23263

&lt;309&gt; 2002-02-11

&lt;313&gt; (672).. (910)

&lt;400&gt; 10

Phe Leu Asn Val Leu Glu Ala Ile Glu Pro Gly Val Val Cys Ala Gly

1 5 10 15

His Asp Asn Asn Gln Pro Asp Ser Phe Ala Ala Leu Leu Ser Ser Leu

20 25 30

Asn Glu Leu Gly Glu Arg Gln Leu Val His Val Val Lys Trp Ala Lys

35 40 45

Ala Leu Pro Gly Phe Arg Asn Leu His Val Asp Asp Gln Met Ala Val

50 55 60

Ile Gln Tyr Ser Trp Met Gly Leu Met Val Phe Ala Met Gly Trp Arg

65 70 75 80

Ser Phe Thr Asn Val Asn Ser Arg Met Leu Tyr Phe Ala Pro Asp Leu  
85 90 95

Val Phe Asn Glu Tyr Arg Met His Lys Ser Arg Met Tyr Ser Gln Cys  
100 105 110

Val Arg Met Arg His Leu Ser Gln Glu Phe Gly Trp Leu Gln Ile Thr  
115 120 125

Pro Gln Glu Phe Leu Cys Met Lys Ala Leu Leu Leu Phe Ser Ile Ile  
130 135 140

Pro Val Asp Gly Leu Lys Asn Gln Lys Phe Phe Asp Glu Leu Arg Met  
145 150 155 160

Asn Tyr Ile Lys Glu Leu Asp Arg Ile Ile Ala Cys Lys Arg Lys Asn  
165 170 175

Pro Thr Ser Cys Ser Arg Arg Phe Tyr Gln Leu Thr Lys Leu Leu Asp  
180 185 190

Ser Val Gln Pro Ile Ala Arg Glu Leu His Gln Phe Thr Phe Asp Leu  
195 200 205

Leu Ile Lys Ser His Met Val Ser Val Asp Phe Pro Glu Met Met Ala  
210 215 220

Glu Ile Ile Ser Val Gln Val Pro Lys Ile Leu Ser Gly Lys Val  
225 230 235

<210> 11

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized oligopeptide

<400> 11

Gly Gly Asn Gly Gly Gly Gly Asn Gly Gly Gly Gly Asn Gly Gly  
1 5 10 15

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/002660

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.<sup>7</sup> C12Q1/02, C07K14/72, 19/00, G01N21/78, 33/15, 33/50,  
A01K67/027//C12N15/09

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.<sup>7</sup> C12Q1/02, C07K14/00-14/825, 19/00, G01N21/78, 33/15, 33/50

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (DIALOG), PubMed, Science Direct, JSTPlus (JOIS)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SATO, M. et al., Fluorescent indicators for imaging protein phosphorylation in single living cells, Nat Biotechnol. (2002), Vol.20, No.3, pages 287 to 294	1-13
A	CALLEJA V. et al., Monitoring conformational changes of proteins in cells by fluorescence lifetime imaging microscopy, Biochem J. (2003), Vol.372, Pt.1, pages 33 to 40	1-13
A	SASAKI, K. et al., Fluorescent indicators for Akt/protein kinase B and dynamics of Akt activity visualized in living cells, J.Biol. Chem. (2003), Vol.278, No.33, pages 30945 to 30951	1-13



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date  
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
19 May, 2005 (19.05.05)

Date of mailing of the international search report  
07 June, 2005 (07.06.05)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/002660

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2001-183366 A (Japan Science and Technology Corp.), 06 July, 2001 (06.07.01), (Family: none)	1-13
A	WO 2002/008766 A1 (JAPAN SCI & TECHNOLOGY CORP.), 31 January, 2002 (31.01.02), & EP 1229330 A1 & US 20030003506 A1	1-13
A	Yoshio UMEZAWA, "Naibunpitsu Kakuran Kagaku Busshitsu no Saibonai Hyoteki Bunshi no Dotei to Atarashii Biomonitoring (2004/01)", Heisei 14 Nendo Senryakuteki Sozo Kenkyu Suishin Jigyo (Kobogata) Team-gata Kenkyu Kenkyu Nenpo (CD-ROM), pages 1 to 11	1-13



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.<sup>7</sup> C12Q1/02, C07K14/72, 19/00, G01N21/78, 33/15, 33/50, A01K67/027 // C12N15/09

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.<sup>7</sup> C12Q1/02, C07K14/00 - 14/825, 19/00, G01N21/78, 33/15, 33/50

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI(DIALOG), PubMed, Science Direct, JSTPlus(JOIS)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	SATO M et al., Fluorescent indicators for imaging protein phosphorylation in single living cells, Nat Biotechnol. (2002), Vol.20, No.3, p.287-294	1-13
A	CALLEJA V et al., Monitoring conformational changes of proteins in cells by fluorescence lifetime imaging microscopy, Biochem J. (2003), Vol.372, Pt. 1, p.33-40	1-13

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

19.05.2005

国際調査報告の発送日 07.6.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

上條 肇

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

4B

9453

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	SASAKI K. et al., Fluorescent indicators for Akt/protein kinase B and dynamics of Akt activity visualized in living cells, J. Biol. Chem. (2003), Vol. 278, No. 33, p. 30945-30951	1-13
A	J P 2001-183366 A (科学技術振興事業団) 2001.07.06 ファミリーなし	1-13
A	WO 2002/008766 A1 (JAPAN SCI & TECHNOLOGY CORP) 2002.01.31 & EP 1229330 A1 & US 20030003506 A1	1-13
A	梅沢喜夫, 内分泌かく乱化学物質の細胞内標的分子の同定と新しいバイオモニタリング (2004/01), 平成14年度戦略的創造研究推進事業 (公募型) チーム型研究研究年報 (CD-ROM), p. 1-11	1-13